

Vorab per Telefax: 08 9/ 23 99 44 65

Europäisches Patentamt

80298 München

Dr.-Ing. Wolfgang Gassner  
European Patent Attorney  
European Trademark Attorney

Dr. rer. nat. Tobias Ehnis  
Dipl.-Biochemiker  
European Trademark Attorney

Kanzlei/ Office  
Nägelsbachstrasse 49A  
91052 Erlangen  
Deutschland/ Germany

Telefon/ Telephone  
+49 (0)9131 - 160 960

Telefax/ Facsimile  
+49 (0)9131 - 160 966

email  
gapat@ip-germany.de

web  
www.ip-germany.de

Datum/Date

10.09.2004

Ihr Zeichen/Your Reference

Unser Zeichen/Our Reference

433038EH-rp

Anmeldung-Nr./Application-No.

PCT/EP03/12694

für/for

Patent

in

PCT

Anmelder/Applicant

november Aktiengesellschaft Gesellschaft für Molekulare  
Medizin

Titel/Title

"Verfahren zum parallelen Nachweis unterschiedlicher Nuk-  
leinsäuren"

Auf den schriftlichen Bescheid gemäß Regel 66 PCT vom  
21.07.2004:

Hiermit wird Antrag auf Durchführung einer eingehenden Sach-  
prüfung gestellt.

Zu den im Internationalen Recherchenbericht zitierten Druckschrif-  
ten wird wie folgt Stellung genommen:

#### Neuheit

Keine der Druckschriften offenbart ein Verfahren, bei welchem bei  
Vorhandensein einer nachzuweisenden Nukleinsäure ein von der

Bankverbindungen  
Bank accounts

Sparkasse Erlangen  
Kto. Nr. 1200 4805  
(BLZ 763 500 00)

HypoVereinsbank  
Kto. Nr. 32 95 222  
(BLZ 763 200 72)

Steuer-Nr.: 216/160/02209  
Ust-IdNr.: DE229240931  
Registergericht: Fürth (Bay.)  
Partnerschaftsregister Nr. 025

Nukleinsäure unabhängiger ausschließlich dem Nachweis dienender Zwischenabschnitt z oder ein dazu komplementärer Zwischenabschnitt z' mittels einer PCR und damit exponentiell amplifiziert wird. Der Zwischenabschnitt z oder der dazu komplementäre Zwischenabschnitt z' dient nicht als Primer-Bindungsstelle. Der Zwischenabschnitt z ist zwischen einem spezifisch die nachzuweisende Nukleinsäure bindenden Teilabschnitt t2 oder t4, welcher bei einer Primer-Verlängerungsreaktion verlängert wird, und einem Teilabschnitt t1 oder t3, dessen Gegenstrang der Bindung eines PCR-Primers dient, angeordnet.

### **Erfinderische Tätigkeit**

Die DE 100 46 184 (D2) wird als nächstliegender Stand der Technik erachtet. Daraus ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäuresequenz mittels einer einen Gegenstrang zu der Nukleinsäuresequenz erzeugenden Reaktion vorgesehen. Dabei wird eine Verbindung bereitgestellt, welche aus einem für eine nachzuweisende Nukleinsäuresequenz spezifischen ersten Primer und einer für den ersten Primer spezifischen Identifizierungssequenz besteht. Die Synthese eines Gegenstrangs zur Identifizierungssequenz wird jedoch verhindert. Alternativ wird zwar ein Gegenstrang zu der Identifizierungssequenz gebildet, die Identifizierungssequenz selbst danach jedoch abgebaut. In jedem Fall wird ein Produkt aus einem doppelsträngigen Bereich und einem einzelsträngigen aus der Identifizierungssequenz oder deren Gegenstrang bestehenden Bereich gebildet. Die Identifizierungssequenz oder der Gegenstrang kann dann mit einer dazu komplementären immobilisierten Bindungssequenz hybridisieren und die Hybridisierung nachgewiesen werden.

Der Unterschied zwischen dem aus der D2 bekannten und dem erfindungsgemäßen Verfahren besteht darin, dass beim erfindungsgemäßen Verfahren ein ausschließlich dem Nachweis dienender Zwischenabschnitt vorgesehen ist, welcher exponentiell durch eine PCR amplifiziert wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein alternatives Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure bereit zu stellen, welches mit einfachen Mitteln durchzuführen ist, eine hohe Sensitivität aufweist und den parallelen Nachweis einer großen Zahl verschiedener Nukleotidsequenzen unter einheitlichen Bedingungen in einem gemeinsamen Reaktionsansatz ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst. Durch den Zwischenabschnitt z kann eine nahezu unbegrenzt große Zahl an spezifischen Kennzeichnungen für Primer und damit für die nachzuweisenden Nukleinsäuren zur Verfügung gestellt werden. Der Zwischenabschnitt z kann darüber hinaus speziell für eine spezifische Hybridisierung mit einer immobilisierten Sonde im Schritt lit. g) gestaltet werden. Dadurch ist ein paralleler spezifischer Nachweis einer großen Zahl von Nukleinsäuren möglich. Durch die exponentielle Amplifikation des Zwischenabschnitts z oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z' wird eine hohe Sensitivität erreicht.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden zunächst erste und zweite Primer-Verlängerungsreaktionen durchgeführt, bei welchen der Zwischenabschnitt nicht vervielfältigt wird. Die erste und zweite Primer-Verlängerungsreaktion muss beim erfindungsgemäßen Verfahren nur einmal oder wenige Mal durchgeführt werden. Auf eine exponentielle Amplifikation kann verzichtet werden. Dadurch wirkt sich bei parallel durchgeführten Nachweisreaktionen eine unterschiedliche Effizienz zwischen unterschiedlichen ersten Primer-Paaren bei der jeweils ersten und zweiten Primer-Verlängerungsreaktion nur geringfügig auf die Menge der bei der danach durchgeführten PCR gebildeten und letztendlich nachzuweisenden dritten Primer-Verlängerungsprodukte aus. Das bei der PCR eingesetzte zweite Primer-Paar kann unabhängig von der Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure gestaltet werden. Dadurch können für alle nachzuweisenden Nukleinsäuren zweite Primer-Paare mit einheitlicher Effizienz bei der PCR bereitgestellt werden. Beispielsweise können dazu alle ersten Primer-Paare einen ersten Primer mit einem einheitlichen ersten Teilabschnitt t1 und einen zweiten Primer mit einem einheitlichen dritten Teilabschnitt t3 aufweisen. Damit lägen zwei für alle nachzuweisenden unterschiedlichen Nukleinsäuren gleiche universelle Primer-Bindungsstellen vor. Dadurch ist es möglich, bei Schritt lit. d) für alle nachzuweisenden Nukleinsäuren ein gemeinsames zweites Primer-Paar bereitzustellen und damit beim Schritt lit. e) eine PCR durchzuführen. Es wird ein paralleler Nachweis einer großen Zahl verschiedener Nukleotidsequenzen unter einheitlichen Bedingungen in einem gemeinsamen Reaktionsansatz ermöglicht.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass auch die Effizienz der Hybridisierung mit der immobilisierten Sonde durch die Wahl der Sequenzen des Zwischenabschnitts z und der Sonde für alle nachzuwei-

senden Nukleinsäuren einheitlich gestaltet werden kann. Dadurch und durch eine einheitliche Effizienz bei der Durchführung der PCR mit den zweiten Primer-Paaren lassen sich die Mengen der nachzuweisenden Nukleinsäuren direkt miteinander vergleichen.

Der D2 ist kein Hinweis auf das erfindungsgemäße Verfahren zu entnehmen. Insbesondere ist der D2 nicht der erfindungsgemäße Grundgedanke zu entnehmen, statt der nachzuweisenden Nukleinsäure eine davon unabhängige ausschließlich dem Nachweis dienende Sequenz exponentiell zu amplifizieren und zum indirekten Nachweis für das Vorhandensein der nachzuweisenden Nukleinsäure zu verwenden. Die D2 legt das erfindungsgemäße Verfahren nicht nahe.

Aus der D1 ist ein Verfahren bekannt, welches eine Multiplex-DNA-Amplifikation einer großen Zahl von Zielsequenzen ermöglicht. Während der Vervielfältigungsreaktion werden Primer in die Produkte eingebaut. Die eingesetzten Primer weisen ein Hybridisierungssegment und ein konstantes Segment auf. Das Hybridisierungssegment hybridisiert mit der Zielsequenz, so dass es durch eine Polymerase verlängert werden kann. Das konstante Segment hybridisiert nicht mit der ursprünglich zu vervielfältigenden Nukleinsäure. Bei der ersten Primerverlängerungsreaktion wird jedoch ein dazu komplementärer Gegenstrang gebildet. Bei einer zweiten Primerverlängerungsreaktion können markierte Primer eingesetzt werden, welche das konstante Segment enthalten und dadurch mit der dazu komplementären bei der ersten Primerverlängerungsreaktion gebildeten Sequenz hybridisieren können. Die resultierenden markierten Amplifikationsprodukte der zweiten Primer-Verlängerungsreaktion können dann nachgewiesen werden. Sie weisen alle dieselbe Markierung auf. Der Nachweis der amplifizierten Nukleotidsequenzen erfolgt entweder gelelektrophoretisch oder durch immobilisierte DNA-Sonden, welche spezifisch mit den nachzuweisenden und amplifizierten Nukleinsäuren hybridisieren. Hier erfolgt also der Nachweis durch eine spezifische Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure und nicht durch eine spezifische Hybridisierung mit einer unabhängig davon bereitgestellten nur dem Nachweis dienenden und daher beliebig gestaltbaren Nukleinsäure. Hinweise auf das erfindungsgemäße Verfahren sind der D1 nicht zu entnehmen.

Auch eine Kombination der Lehren aus der D1 mit den Lehren aus der D2 würde das erfindungsgemäße Verfahren nicht nahe legen. Die Kombination würde ein

Verfahren ergeben, bei welchem in einer Primerverlängerungsreaktion ein Gegenstrang zur Identifizierungssequenz gebildet wird, der dann zur Erhöhung der Sensitivität mittels einer PCR vervielfältigt wird. Da die Identifizierungssequenz gemäß der D2 dem konstanten Segment gemäß der D1 entspricht, würde für die PCR ein Primer eingesetzt werden, welcher eine mit der Identifizierungssequenz identische Sequenz aufweist und an den bei der Primerverlängerungsreaktion gebildeten Gegenstrang zur Identifizierungssequenz bindet. Die Amplifikation einer Sequenz, welche weder der Bindung an die nachzuweisende Nukleinsäure noch direkt oder indirekt (auf dem dazu komplementären Gegenstrang) der Bindung von Primern dient, wird dadurch aber nicht nahe gelegt.

Shuber A.P. et al. (D3) und die WO 96/41012 (D4) offenbaren ein Multiplex-PCR-Verfahren, bei welchem universelle Primer eingesetzt werden, welche eine gleichzeitige Amplifikation unterschiedlicher Nukleinsäuren unter einheitlichen Bedingungen ermöglichen. Der Nachweis der amplifizierten Nukleinsäuren erfolgt hier jedoch gelelektrophoretisch. Der Gedanke eine ausschließlich dem Nachweis dienende exponentiell zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz vorzusehen ist durch die D3 und die D4 nicht nahe gelegt.

Aus der WO 02/14534 A2 (D5) ist ein Verfahren zum Nachweis einer Zielnukleotidsequenz in einer Probe bekannt, bei welchem ein erster Primer eingesetzt wird, welcher einen Überhang aufweist und ein zweiter Primer, welcher Mittel zur Bindung aufweist. Nach Durchführung einer ersten PCR mit der Zielsequenz und diesen Primern wird ein Strang vom anderen Strang der gebildeten Produkte mittels der Mittel zur Bindung entfernt und einer der beiden Stränge mittels einer für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifischen Sonde nachgewiesen. Hinweise darauf, eine unabhängig von der nachzuweisenden Nukleinsäure bereitgestellte Nukleinsäuresequenz zu amplifizieren und zum indirekten Nachweis für das Vorhandensein der nachzuweisenden Nukleinsäure zu verwenden, sind auch der D5 nicht zu entnehmen.

Aus Brownie J. et al. (D9) ist ein Verfahren zum Verhindern der Bildung von Primer-Dimeren in einer PCR bekannt. Dabei werden Primer mit einem aus einer zusätzlichen Nukleotidsequenz bestehenden Anhang an ihrem 5'-Ende verwendet. Diese Primer sind in einer so niedrigen Konzentration in der PCR vorhanden, dass sie nur an frühen Zyklen der PCR teilnehmen. In weiteren PCR-Zyklen dient ein einzelner

die Sequenz des Anhangs aufweisender Primer der Amplifikation. Die Sequenz des Anhangs führt bei aus Primer-Dimeren gebildeten Amplifikationsprodukten dazu, dass komplementäre von der Sequenz des Anhangs abgeleitete Sequenzen eines einzelsträngigen Amplifikationsprodukts miteinander hybridisieren und dabei eine Art "Pfannenstil"-Struktur bilden. Durch die Hybridisierung wird das Annealing von weiteren Primern an den Anhang verhindert und dadurch die Produktion unerwünschter PCR-Produkte vermieden. Die PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch nachgewiesen. Ein Verfahren, bei welchem eine nur dem Nachweis dienende Nukleotidsequenz exponentiell amplifiziert wird, wird auch durch die D9 nicht nahe gelegt.

Da keinen der genannten Druckschriften das Merkmal einer exponentiell zu amplifizierenden nur dem Nachweis durch Hybridisierung dienenden Zwischensequenz zu entnehmen ist, kann auch durch eine Kombination der Merkmale der Entgegenhaltungen nicht zum erfindungsgemäßen Gegenstand gelangt werden.

Es wird darum gebeten, die Patentfähigkeit des vorliegenden Anspruchsbegehrens anzuerkennen. Hilfsweise wird die Durchführung einer mündlichen Anhörung beantragt.



Dr. W. Gassner  
Patentanwalt